Revue suisse Zool.	Tome 89	Fasc. 4	p. 851-858	Genève, décembre 1982

Das Follikelepithel während der paedogenetischen Entwicklung der Gallmücke *Heteropeza pygmaea* (Cecidomyiidae, Diptera)

von

R. CAMENZIND *

Mit 1 Abbildung und 3 Tabellen

ABSTRACT

The follicular epithelium during paedogenetic development of the gall midge Heteropeza pygmaea **(Cecidomyiidae, Diptera).** — In the larval ovaries of *H. pygmaea* the formation of follicles takes place after the last, incomplete oogonial division. Mesodermal cells fuse with one of the daughter cells and together they form the nurse chamber, while the other daughter cell becomes the oocyte. This oocyte-nurse-chamber complex is then surrounded by other mesodermal cells which form the follicular epithelium. The follicles are released into the hemocoel of the mother larva where they mature and go through the whole of embryogenesis. In the course of this development the volume of the embryo increases about 200 fold and the surface of its follicular epithelium about 50 fold. Some of the follicles and embryos may also degenerate. — By counting the cells of the follicular epithelium we found that stages in meiosis and in cleavage have a higher average number of cells than younger stages of the same mother larvae. As we never found cells of the follicular epithelium in division we conclude that follicles with a lower number of cells in the epithelium have a lower rate of survival in the maternal hemolymph. By such a selective degeneration the average number of cells in the follicular epithelium of surviving embryos would increase. The expansion of the follicular epithelium during development is not the result of cells division but it must be due to surface growth.

---

* Entomologisches Institut der ETH Zürich, ETH-Zentrum, CH-8092 Zürich, Schweiz.
Vortrag gehalten an der Jahresversammlung der SZG in Neuchâtel, 12.—13. März 1982.

EINLEITUNG

Heteropeza pygmaea kann sich bereits im Larvenstadium durch Entwicklung unbefruchteter Eier vermehren. Bei dieser als Paedogenese bezeichneten Fortpflanzung werden im Ovar junger weiblicher Larven Eifollikel gebildet, indem nach der letzten, mit unvollständiger Zytokinese ablaufenden Oogonienteilung eine Tochterzelle mit mehreren mesodermalen Zellen des Ovars fusioniert und so zur Nährkammer wird. Der von der Keimbahn stammende Kern in dieser Nährkammer wird als G-Trophozytenkern bezeichnet, die Kerne mesodermaler Herkunft als M-Trophozytenkerne. Die andere Tochterzelle aus der unvollständigen Oozytenteilung wird zur Oozyte, ihr Kern zum Oozytenkern. Dieser Oozyten-Nährkammer-Komplex wird dann von mesodermalen Zellen umgeben, welche zusammen das Follikelepithel bilden. Die fertigen Follikel verlassen das Ovar, wachsen in der Leibeshöhle der weiblichen Larve zu reifen Follikeln heran und durchlaufen hier auch die ganze Embryonalentwicklung bis zu jungen Larven, die schliesslich aus der kurz vorher abgestorbenen Mutterlarve ausschlüpfen. Diese ganze Entwicklung findet innerhalb des Follikelepithels statt. Ein Chorion wird bei dieser paedogenetischen Fortpflanzung nicht ausgebildet. Das Follikelepithel hat wahrscheinlich eine wichtige Aufgabe bei der Aufnahme von Nährstoffen während der Follikelreifung und Embryonalentwicklung, denn beide Vorgänge sind mit einem starken Wachstum verbunden. Die aus dem Ovar entlassenen Follikel haben eine Länge von ca. 40 μm, die schlüpfreifen Larven eine Länge von ca. 1200 μm (Went 1971). Das Volumen nimmt um etwa das 200-fache zu, die Oberfläche um etwa das 50-fache. Mich interessierte nun die Frage, wie sich bei diesem Wachstum das Follikelepithel verhält.

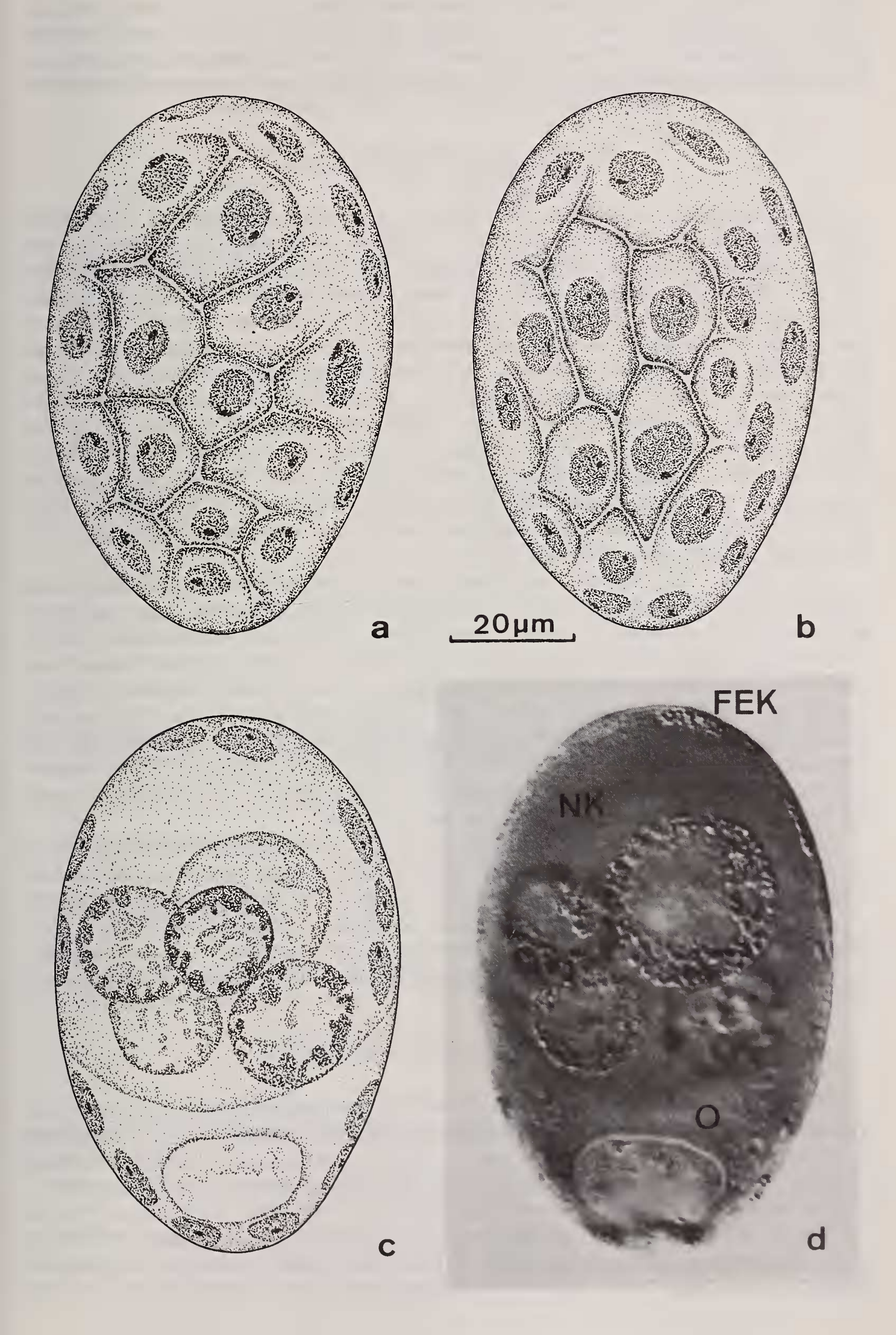
Die bisherigen spärlichen Befunde sind kontrovers. Tucker & Meats (1976) haben das Wachstum der Follikel und Embryonen von *Heteropeza pygmaea* im Hinblick auf die Formgebung untersucht, um abzuklären, welche Rolle die Mikrotubuli als Skelettelemente dabei spielen. Mit einer Silberfärbung haben sie dabei auch die Follikelepithel-Zellgrenzen sichtbar gemacht. Sie sind zum Schluss gekommen, dass sich die Zahl der Zellen von etwa 14 bei ganz jungen Follikeln von ca. 30 μm Länge bis auf 100 bei Embryonen von 250 μm Länge, also etwa einem Stadium kurz nach dem Blastoderm, erhöht. Über die Art und Weise der Zellvermehrung haben sie sich nicht geäussert. Bei meinen zytologischen Untersuchungen an *Heteropeza pygmaea* (Camenzind 1966) und an der verwandten Gallmücke *Mycophila speyeri* (Camenzind 1971) wurden immer auch die Kerne der Follikelepithelzellen mitangefärbt. Eine Kernteilung konnte ich nie feststellen. Kahle (1908) fand bei der Gallmücke *Miastor metraloas* Kernteilungen nur im Epithel von Follikeln, die sich noch im Ovar, befanden, nicht jedoch in Entwicklungsstadien in der Haemolymphe.

Um die Frage zu klären, ob sich das Follikelepithel während der mit Wachstum verbundenen Follikelreifung und Embryonalentwicklung durch Zellteilung oder nur

---

Abb. 1.

Junger, weiblich determinierter Follikel von *Heteropeza pygmaea*. a. Follikelepithelzellen auf der Oberseite. b. Follikelepithelzellen auf der Unterseite. c. mittlere Ebene. d. Interferenzkontrastaufnahme, gleiche Fokusebene wie c. FEK: Follikelepithel-Zellkern; NK: Nährkammer mit 3 Nährkernen im Fokus; O: Oozyte mit Oozytenkern.


a
20µm
b
FEK
NK
O
c
d

durch Ausdehnung der ursprünglich vorhandenen Zellen oder durch beide Vorgänge zusammen vergrössert, habe ich an fixierten und gefärbten, weiblich determinierten Entwicklungsstadien von *Heteropeza pygmaea* die Zahl der Follikelepithelzellen ermittelt. Zur Untersuchung gelangten ganz junge Follikel bis Embryonen im Blastodermstadium.

MATERIAL UND METHODEN

Für die Untersuchung wurde die Linie 2K von *Heteropeza pygmaea* (Camenzind 1962) verwendet. Die weiblichen Larven mit Follikeln und Embryonen im gewünschten Alter wurden in 45% iger Essigsäure geöffnet, die austretenden Entwicklungsstadien von den Teilen der Mutter isoliert und anschliessend während 20 min in Orcein-Milchsäure (Camenzind 1966) gefärbt. Dann wurde die Färbelösung durch Milchsäure ersetzt und diese nach 10 min Differenzierungszeit durch Isopropylalkohol verdrängt. Die Follikel und Embryonen wurden in ein alkohollösliches Einschlussmittel eingebettet. Durch Auflegen des Deckglases wurden die grösseren Embryonen leicht abgeflacht, während die kleineren ihre Form unverändert beibehielten. Die Kerne der Follikelepithelzellen färben sich mit Orcein kräftig rot an, während das Zytoplasma hellrot erscheint. In besonders günstigen Fällen konnten auch die Zellgrenzen gesehen werden (Abb. 1). Es konnte dabei festgestellt werden, dass immer nur ein Kern pro Zelle vorhanden ist. Deshalb wird im folgenden von der Anzahl ausgezählter Kerne immer auf die Anzahl Follikelepithelzellen geschlossen.

Es wurden 125 Follikel und Embryonen im Interferenzkontrast-Mikroskop untersucht, ihre Umrisse mit dem Zeichenapparat festgehalten und dann die Follikelepithelkerne des oberen, mittleren und unteren Drittels mit verschiedenen Farben eingezeichnet und anschliessend ausgezählt (vgl. Abb. 1a-c). Zeichnung und Auszählung wurden von einer zweiten Person kontrolliert. In den meisten Fällen stimmten die Ergebnisse der Auszählungen überein. In etwa 10% der Fälle differierten sie um 1 bis maximal 3 Kerne. Besonders schwierig war das Auffinden der Follikelepithelkerne unterhalb der Nährkammer älterer Embryonen, weil ihre degenerierenden Nährkerne sich sehr intensiv anfärbten und der Abstand zum Follikelepithel sehr gering war, sodass nicht immer mit letzter Sicherheit jeder Kern gefunden werden konnte.

Anhand der Anzahl Furchungskerne wurde das Entwicklungsstadium bestimmt. Da die Kerne eines Embryos sich nicht immer synchron teilen, wurde jeweils der am weitesten fortgeschrittene Furchungskern zur Festlegung des Mitosestadiums verwendet.

In den untersuchten Entwicklungsstadien wurde auch die Anzahl Nährkerne festgestellt. Von der 4. Furchungsteilung an war das allerdings nur noch vereinzelt möglich, da die Nährkerne dann bereits am Degenerieren sind und miteinander verklumpen.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Tabelle 1 enthält die mittlere Anzahl der Follikelepithelzellen von Follikeln und von Embryonen zwischen erster Furchungsteilung und Blastoderm. Mit Ausnahme der Embryonen in der 1. Furchungsteilung, von denen allerdings nur 6 untersucht werden konnten, haben die Entwicklungsstadien von der Reifeteilung an etwa 7 bis 9 Follikelepithelzellen mehr als junge bis reife Follikel.

Tabelle 2 enthält die Zahl der Nährkerne in 3 Entwicklungsabschnitten. Bei Eiern in der Reifeteilung und bei Embryonen ist diese Zahl deutlich höher als in jüngeren Stadien.

TABELLE 1.

Zahl der Follikelepithelzellen weiblich determinierter Follikel und Embryonen von Heteropeza pygmaea *während ihrer paedogenetischen Entwicklung*

Entwicklungsstadium	Mittelwert und mittlere Streuung	N
junge bis reife Follikel	28,54 ± 1,60	22
Reifeteilung	36,44 ± 1,85	18
1. Furchungsteilung	30,00 ± 2,87	6
2. Furchungsteilung	35,61 ± 1,10	18
3. Furchungsteilung	36,50 ± 2,08	12
4. Furchungsteilung	39,31 ± 1,93	16
5. Furchungsteilung	39,21 ± 2,62	14
6. Furchungsteilung bis Blastoderm	39,95 ± 1,81	19

TABELLE 2.

Zahl der Nährkerne in 3 Entwicklungsabschnitten von weiblich determinierten Follikeln und Embryonen von Heteropeza pygmaea *während ihrer paedogenetischen Entwicklung*

Entwicklungsabschnitt	Mittelwert und mittlere Streuung	N
junge bis reife Follikel	2,54 ± 0,21	22
Reifeteilung	4,39 ± 0,31	18
1. Furchungsteilung bis Blastoderm	4,07 ± 0,15	40

Tabelle 3 zeigt die durchschnittliche Anzahl von Follikelepithelzellen bei Follikeln und Embryonen mit gleicher Nährkernzahl. Zwischen den beiden Grössen besteht eine positive Korrelation.

Aus den drei Aussagen aus den Tabellen 1-3 könnte gefolgert werden, dass eine Vermehrung der Follikelepithelzellen und der Nährkerne im Laufe der Reifeteilung und der Furchungsteilungen stattfindet. In den 125 untersuchten Entwicklungsstadien wurde aber nur in 2 ganz jungen, frisch aus dem Ovar entlassenen Follikeln je eine Epithelzelle mit einem metaphaseähnlichen Teilungsstadium mit leicht verklumpten Chromosomen

Tabelle 3.

Zahl der Follikelepithelzellen weiblich determinierter Follikel und Embryonen von Heteropeza pygmaea *mit gleicher Nährkernzahl*

Anzahl Nährkerne	Anzahl Follikelepithelzellen Mittelwert und mittlere Streuung	N
2	26,31 ± 1,49	13
3	33,50 ± 1,55	20
4	34,28 ± 0,98	25
5	36,60 ± 1,50	15
6	44,83 ± 4,16	6
7	(54)	1

gefunden. In allen 80 Entwicklungsstadien, in denen auch die Zahl der Nährkerne ermittelt werden konnte (Tabelle 3), wurde nie eine Teilung der insgesamt über 300 Kerne beobachtet.

Wie lässt sich diese Diskrepanz erklären?

Die Follikel und Embryonen in den 20 untersuchten Präparaten stammten von jeweils 5-7 Mutterlarven von annähernd gleichem Alter. In den Ovarien der einzelnen Larven werden die Follikel zudem nicht ganz synchron gebildet. Die Anzahl mesodermaler Zellen, welche für den Aufbau der Nährkammern zur Verfügung stehen, ist wahrscheinlich limitiert. Das Gleiche gilt wohl auch für die mesodermalen Zellen, welche für die Bildung des Follikelepithels verwendet werden können. Die jüngsten Stadien in den untersuchten Präparaten sind die zuletzt gebildeten Follikel in den Ovarien. Für sie steht vermutlich nur noch eine beschränkte Anzahl mesodermaler Zellen zur Verfügung. Das hat zur Folge, dass ihre Nährkammer im Durchschnitt weniger Kerne enthält und dass ihr Follikelepithel aus weniger Zellen besteht.

Im Laufe der Follikelreifung und Embryonalentwicklung degenerieren immer wieder Follikel und Embryonen (Went 1972), besonders wenn die Ernährungsbedingungen für die Mutterlarve nicht optimal sind. Es ist wahrscheinlich, dass Follikel mit geringerer Nährkernzahl und mit kleinerer Anzahl von Follikelepithelzellen, also die jüngsten Stadien, dieser Degeneration besonders ausgesetzt sind, während die älteren Stadien mit mehr Nährkernen und Follikelepithelzellen sich in der Haemolymphe der Mutter besser entwickeln können. Durch eine solche Selektion liesse sich erklären, warum ältere Entwicklungsstadien im Durchschnitt mehr Follikelepithelzellen haben als jüngere.

In den Präparaten wurden neben den normalen Entwicklungsstadien immer auch „unvollständige Follikel" gefunden, die auffällig klein waren und nur aus einer Nährkammer mit einem G-Trophozytenkern und 0-3 M-Trophozytenkernen bestanden. Bei diesen unvollständigen Follikeln hatte die letzte Oogonienteilung wahrscheinlich gar

nicht stattgefunden oder die Zellsteilung war vollständig abgelaufen, sodass nur eine Nährkammer ohne dazugehörige Oozyte entstanden war. Bei 9 unvollständigen Follikeln konnte die Zahl der Follikelepithelzellen ermittelt werden. Sie lag mit 16,0 ± 1,98 deutlich unter dem Durchschnitt von vollständigen Follikeln (Tabelle 1). Die Beobachtungen von Tucker & Meats (1976), wonach die jüngsten von ihnen untersuchten Stadien von *Heteropeza pygmaea* etwa 14 Follikelepithelzellen enthalten, lassen sich durch die vorliegenden Ergebnisse nicht bestätigen. Möglicherweise handelte es sich bei jenen Stadien ebenfalls um unvollständige Follikel, welche mit der angewandten Silberlinienfärbung aber nicht als solche erkannt werden konnten. Die hohe Zahl von Follikelepithelzellen in den ältesten von den beiden Autoren untersuchten Stadien steht in völligem Widerspruch zu den vorliegenden Resultaten. Entweder haben sie eine Linie von *Heteropeza pygmaea* untersucht, die ein völlig anderes Verhalten des Follikelepithels zeigt, was allerdings nicht sehr wahrscheinlich ist, da die Entwicklung sonst wie in unserer Linie verläuft, oder die Silberlinienfärbung zeigt nicht die Zellgrenzen im Follikelepithel und kann somit nicht für die Ermittlung der Zellzahl verwendet werden. Ein direkter Vergleich der beiden untersuchten Linien könnte diese Frage klären.

ZUSAMMENFASSUNG

Im Ovar der Larven von Heteropeza pygmaea werden Follikel gebildet, indem nach der letzten, unvollständigen Oogonienteilung die eine Tochterzelle durch Fusion mit mesodermalen Zellen zur Nährkammer wird, während die andere Tochterzelle zur Oozyte wird. Dieser Oozyten-Nährkammer-Komplex wird dann von mesodermalen Zellen umgeben, welche zusammen das Follikelepithel bilden. Die Follikel verlassen das Ovar, reifen unter Grössenzunahme in der Haemolymphe heran und durchlaufen hier auch die mit starker Volumen- und Oberflächenzunahme verbundene Embryonalentwicklung. Das Follikelepithel bildet während der ganzen Zeit den äusseren Abschluss. Durch Auszählen der Follikelepithelzellen wurde festgestellt, dass Stadien in der Reifeteilung und Embryonen im Durchschnitt mehr Follikelepithelzellen haben als jüngere Stadien aus den gleichen Mutterlarven. Da aber im Epithel keine Zellteilungen gefunden werden konnten, wird vermutet, dass Follikel mit geringerer Zellzahl eine kleinere Überlebenschance in der Haemolymphe haben. Durch eine selektive Degeneration würde also die durchschnittliche Zahl der Follikelepithelzellen bei den überlebenden Embryonen zunehmen. Die Vergrösserung des Follikelepithels geschieht bei ihnen lediglich durch Flächenwachstum, nicht durch Zellteilung.

Dank

Ich danke Frau G. Rhyner für die sehr gewissenhafte Auswertung der Präparate und für die sorgfältige Ausführung der Zeichnungen in Abb. 1.

LITERATURVERZEICHNIS

Camenzind, R. 1962. Untersuchungen über die bisexuelle Fortpflanzung einer paedogenetischen Gallmücke. *Revue suisse Zool.* 69: 377—384.

— 1966. Die Zytologie der bisexuellen und parthenogenetischen Fortpflanzung von *Heteropeza pygmaea* Winnertz, einer Gallmücke mit pädogenetischer Vermehrung. *Chromosoma* 18: 123—152.

— 1971. The Cytology of Paedogenesis in the Gall Midge *Mycophila speyeri*. *Chromosoma* 35: 393–402.

Kahle, W. 1908. Die Paedogenesis der Cecidomyiden. *Zoologica* 21: 1—80.

Went, D. F. 1971. *In Vitro* Culture of Eggs and Embryos of the Viviparous Paedogenetic Gall-midge *Heteropeza pygmaea*. *J. exp. Zool.* (3) 177: 301–311.

— 1972. Zeitrafferfilmanalyse der Embryonalentwicklung *in vitro* der vivipar paedogenetischen Gallmücke H*eteropeza pygmaea*. *Wilhelm Roux Arch. Entw. Mech. Org.* 170: 13—47.

Tucker, J. B. and M. Meats. 1976. Microtubules and Control of Insect Egg Shape. *J. Cell Biol.* 71: 207–217.